

## ランの無菌培養における初期生長促進に関する研究 I

宮 崎 貞 巳・永 松 孝

(園芸学研究室)

Studies on the Promotion of the Early Growth *in vitro* of Orchid. I

By

Sadami MIYAZAKI and Takashi NAGAMATSU

(Laboratory of Horticulture)

### 要 約

ラン, *Dendrobium nobile* の無菌培養における初期生長を促進する目的で実験を行ない, 発芽, 生長に及ぼす培養容器, 基本培養基の種類並びにキレート剤, 生長調整物質添加の影響を調査した。結果は以下のである。

1. 水分の蒸発が早く, 空気の流通がよい綿栓フラスコ (100ml.) が, 同容量のゴム栓枝付フラスコやビニール管付ゴム栓フラスコよりも幼苗の生長に対して適していた。
2. 微量要素添加の Knudson C 培養基が, 同じ微量要素を添加した La Garde 培養基よりも幼苗の生長に対して優れていた。
3. 基本培養基 (Knudson C+微量要素) に EDTA を添加して, 初期の pH を 5.20 に調整した培養基中で, 幼苗の生長は促進され, 濃緑色で健全な幼苗が得られた。
4. IAA (0.1, 1, 10 ppm) は発芽, 生長を抑制した。 *Dendrobium* の幼苗の生長促進には 0.1 ppm 以上の濃度では使用すべきでない。
5. GA (1. 10. 100 ppm) は種子の発芽, その後の生長促進に有効であった。高濃度 (100 ppm) では, 茎葉の細長い苗が認められた。
6. 培養基の pH は, 幼苗の生長に伴って酸性に傾いた。特に, 播種後 6 週間頃から急速に低下し, 12 週間後にはほぼ 3.7 となった。

### Summary

Experiments were initiated in order to promote the early growth of orchid, *Dendrobium nobile*, in the asymbiotic culture. The effects of the kind of culture flasks, basal media and addition of a chelating agent, growth regulators to basal media on the germination of the seeds and the growth of the seedlings were studied. The results obtained are as follows:

1. Erlenmeyer flasks (100 ml.) plugged with cotton, which allows rapid evaporation of the water in a culture medium and free circulation of air, gave better growth of the seedlings than both rubber-stoppered distillation flasks and Erlenmeyer flasks closed with rubber stoppers passed vinyl tubes in the same volume.
2. The early growth of the seedlings on Knudson C media with micro nutrients was

better than those on La Garde media with the same micro nutrients.

3. When the seedlings were grown in basal media (Knudson C sol. plus micro nutrients) containing a chelating agent, EDTA, with the initial pH of 5.20, the growth of them was promoted, and the seedlings produced were greener and stronger.

4. Indoleacetic acid at three different concentrations (0.1, 1, 10 ppm) in the basal media inhibited both the germination of the seeds and the growth of the seedlings. It should not be used at more than 0.1 ppm for the early growth of *Dendrobium* seedlings.

5. Addition of gibberellin at three different concentrations (1, 10, 100 ppm) to the basal media as a supplement was very effective for the rapid germination of the seeds and the progress to form small plantlets, although there were a few poor seedlings affected by the chemical at high concentration (100 ppm).

6. The pH of the media tended to increase acidity with the growth of the seedlings. Especially, about 6 weeks after sowing, the pH level decreased rapidly and the final pH (after 12 weeks) was about 3.7.

## は じ め に

1922年, Knudson 氏がランの無菌培養法に成功して以来, 今日まで多くの研究者によって, 各種の養分培地の研究が行なわれ<sup>27)</sup>, 一応, ランの無菌培養法に関する問題は解決された感がある. しかし, ランの実生は開花までに長年月を要し, 比較的に生長が早い *Dendrobium* でも, 開花までに通常4年位かかる. この期間を短縮し, 開花を早めるには, ランの無菌培養における初期生長を促進することが望まれる.

本実験は, ランの無菌培養における初期生長を促進する目的で行なったもので, 発芽, 生長に及ぼす培養容器, 基本培養基の種類並びにキレート剤, 生長調整物質添加の影響を調査した.

この研究を行なうにあたって, 終始御指導を賜った当研究室の島田恒治教授, 山田嘉夫助教授に厚く御礼申し上げます.

## 実 験 I

### 材 料 並 び に 方 法

供試したランは, 数年来本学で栽培してきた *Dendrobium nobile* である. 1963年3月10日に温室内で自家受粉させ, 約10ヵ月後の1964年1月20日に採種した種子を実験に供した.

基本培養基には微量要素を加えた Knudson C 培養基 (以下 KC と略す), 並びに La Garde 培養基 (以下 LG と略す) を用いた. その組成は下記の通りである.

Knudson C 培養基	La Garde 培養基
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....0.25 gm.	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....1.00 gm.
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O .....1.00	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O .....1.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....0.50	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....1.00
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....0.25	CaCl <sub>2</sub> .....1.00
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....0.025	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....0.50
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....0.0075	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> · H <sub>2</sub> O .....0.50
Sucrose .....20.00	FePO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O .....0.33
Agar .....15.00	Sucrose .....20.00
Dist. water .....1000ml.	Agar .....15.00
	Dist. water .....1000ml.

上記の各培養基に、下記の微量要素を 1 l 当り 2 ml. 添加した.

$H_3BO_3$ .....	0.05 gm.	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ .....	0.03 gm.
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ .....	0.25	$ZnCl_2$ .....	0.15
$Na_2Mo_4 \cdot 2H_2O$ .....	0.025	Dist. water .....	1000ml.
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ .....	0.05		

キレート剤加用区 (以下 +EDTA と略す) は, Knudson C 培養基を処方に従って調製中に,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  を加え, 直ちに, この硫酸第 1 鉄と等モルのキレート剤 (Disodium ethylenediamine tetraacetate) を添加して作った.

培養基の pH は, ガラス電極 pH メーター (日立・堀場製 T 型) で 5.20 並びに 6.00 に, 0.1 規定塩酸, または 0.1 規定苛性ソーダを滴下して調整した.

また, 生長調整物質加用区 [以下 +IAA, +GA, + (IAA+GA) と略す] は, 微量要素を加えた Knudson C 培養基, つまり, 基本培養基に, Indoleacetic acid 並びに Gibberellin (協和醸酵 K. K. 製) を一定の濃度になるように加えて調製した.

培養容器は綿栓フラスコ (綿栓をした 100 ml. の三角フラスコ), 枝付きフラスコ (枝部の先端に綿栓をし, 口部にはゴム栓をした 100 ml. の枝付き三角フラスコ), および, ゴム栓フラスコ (100 ml. の三角フラスコにゴム栓をし, これに径 3 mm のビニール管を通したもの) の 3 種類を用い, いずれも 120°C, 30 分間乾熱殺菌した後に, 上記の各種培養基を 40 ml. ずつ分注し, 100°C, 30 分間ずつ, 3 日間間歇殺菌した.

種子は, デシケーター中に保存していた蒴から取り出し, 晒粉 10 gm. に蒸留水 140 ml. を加えて戸過した汙液に, 20 分間浸漬して殺菌した.

播種は, 殺菌燈をつけた無菌室内で, 種子を殺菌しているクロール・カルキ溶液に, 3 倍量の滅菌水を加えて殺菌液の濃度を低下させ, 種子を殺菌液にできるだけ均一に分散させて, 殺菌液と種子とを一緒にスポイトで 1 ml. 吸い上げて行なった. 播種日は 1964 年 1 月 21 日である.

播種後, 綿栓フラスコの綿栓部は硫酸紙で被い, 他の容器はそのままで, 室内に放置し, 種子殺菌の際の塩素ガスがぬけるのをまって, 1 月 23 日に温室内に設けた 25°C のフレイムに入れた.

調査については, 播種後 1 週間毎に, 試料を無菌室内で採取し, グリセリン酢酸で固定し, 検鏡標本を作って, ミクロメーターで胚の大きさを測り, 播種後 4 週間目には第 1 葉を出葉した個体が認められたので, 4 週間目以後は出葉数別の個体数の割合を 50 個体について調査した. 各実験区には, 3~5 本のフラスコを用意し, 12 週間にわたって, 毎週 1 本のフラスコから材料を部分的に, 無作為に採取して調査に供した.

供試した培養容器, 培養基の種類, 個数は下記の通りである.

実 験 区		綿栓フラスコ		枝付きフラスコ	ゴム栓フラスコ
		Knudson C	La Garde	Knudson C	Knudson C
基本培養基	pH 5.20	5本	5本	4本	3本
基本培養基	pH 6.00	3	3	3	3
+ EDTA	pH 5.20	3	—	—	—
+ EDTA	pH 6.00	3	—	—	—
+ IAA 1ppm	pH 5.20	4	—	—	—
+ IAA 10ppm	〃	3	—	—	—
+ GA 1ppm	〃	3	—	—	—
+ GA 10ppm	〃	3	—	—	—
+ (IAA 1ppm + GA 1ppm)	〃	3	—	—	—
+ (IAA 10ppm + GA 10ppm)	〃	3	—	—	—

## 結 果

## 初期の生長過程

ラン種子は極めて粗い一層の種皮内に、殆んど、あるいは全く貯蔵養分を含まないで、未分化の胚—幼芽、子葉が分化していない細胞塊—を内包している<sup>28)</sup>、といわれている。

播種後、間もなく、胚は肥大し始め、種皮が破れて種皮外に出る。初め卵形をしていた胚は、次第に球形に近ずき、未だ葉、根の分化がみられない原塊体 (protocorm) となり、仮根が現われる (写真1~6)。その後、原塊体に葉緑体ができ、緑色を帯び、緑色の濃い部分と、その反対側の淡い部分に突起を生じ、前者の部分に葉が、後者の部分に根が分化する (写真7, 8)。葉と根の出現の時間的關係は、先ず、葉がみられるのが普通であるが、まれに、根が先に現われるものもみられる。

## 胚の肥大

播種後3週間までは、培養容器、培養基、pH、その他を異にしたいずれの区でも、葉、根は認められなかった。第1, 2, 3表は3週間までの胚の肥大を調べたものである。実験区の間に

第1表 胚の肥大と培養容器との関係

培養容器	1			2			3		
	長径	短径	短径/長径	長径	短径	短径/長径	長径	短径	短径/長径
綿 栓 フラスコ	116 $\mu$	71 $\mu$	0.66	179 $\mu$	133 $\mu$	0.74	220 $\mu$	183 $\mu$	0.83
枝 付 き フラスコ	100	65	0.65	287	152	0.81	212	178	0.84
ゴム 栓 フラスコ	113	78	0.69	185	139	0.75	155	101	0.65

註. 30個体の平均, KC 培養基使用

第2表 胚の肥大に及ぼす培養基の影響

培養基の種類	1			2			3		
	長径	短径	短径/長径	長径	短径	短径/長径	長径	短径	短径/長径
Knudson C	116 $\mu$	71 $\mu$	0.66	179 $\mu$	133 $\mu$	0.74	220 $\mu$	183 $\mu$	0.83
La Garde	137	96	0.74	178	143	0.80	217	181	0.83

註. 30個体の平均, 綿栓フラスコ使用

第3表 胚の肥大に及ぼす pH, EDTA, IAA, GA の影響

実験区	pH	1			2			3		
		長径	短径	短径/長径	長径	短径	短径/長径	長径	短径	短径/長径
基本培養基	5.20	116 $\mu$	71 $\mu$	0.66	179 $\mu$	133 $\mu$	0.74	220 $\mu$	183 $\mu$	0.83
基本培養基	6.00	125	80	0.64	183	112	0.61	182	135	0.74
+EDTA	5.20	137	101	0.74	171	132	0.77	158	116	0.73
+EDTA	6.00	126	87	0.65	175	125	0.71	221	176	0.80
+IAA 1 ppm	5.20	162	127	0.78	179	145	0.81	182	140	0.77
+IAA 10 ppm	"	119	85	0.71	159	110	0.69	161	114	0.71
+GA 1 ppm	"	136	96	0.71	183	140	0.77	196	152	0.78
+GA 10 ppm	"	126	83	0.66	175	132	0.75	206	166	0.81
+(IAA 1ppm+GA 1ppm)	"	—	—	—	183	149	0.81	249	218	0.88
+(IAA 10ppm+GA 10ppm)	"	145	90	0.62	171	124	0.73	170	122	0.72

註. 30個体の平均, 綿栓フラスコ, KC 培養基使用

大差は認められないが、胚は経時的に肥大し（播種直前の胚の大きさは長径  $132\mu$ 、短径  $52\mu$ 、短径と長径の比 0.40）、特に、短径が急速に大きくなり、短径と長径の比が次第に 1 に近ずき、球形を呈した。

#### 培養容器、基本培養基の組成・pH の影響

生長に好適な培養容器は綿栓フラスコで、次は枝付フラスコであった。ゴム栓フラスコ中の種子の胚は播種後 2 週間までは順調に肥大したが、その後の生長は悪く、実験期間を通じて、葉を分化した個体は全く認められなかった（第 1、4 表）。

微量要素を加えた Knudson C 培養基では 5 週間後に第 1 葉を出葉した個体が認められたが、La Garde 培養基では 8 週間後に第 1 葉が現われ、その後の生長も Knudson C 培養基中のものより遅れた（第 5 表）。

第 4 表 生長に及ぼす培養容器の影響

培養容器	週											
	出葉数											
	4	5	6	7	8	9	10		11		12	
	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2
綿栓フラスコ	0	8	6	12	20	24	20	0	32	0	36	30
枝付フラスコ	0	0	8	2	6	2	8	2	30	0	10	14
ゴム栓フラスコ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

註. 数字は 50 個体中の展開葉を有する個体の百分率，K C 培養基使用

第 5 表 生長に及ぼす基本培養基の組成の影響

培養基の種類	週									
	出 葉 数									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Knudson C	0	8	6	12	20	24	20	32	36	30
La Garde	0	0	0	0	8	4	12	14	22	0

註. 数字は 50 個体中の展開葉を有する個体の百分率，綿栓フラスコ使用

第 6 表 生長に及ぼす培養基の pH, EDTA, IAA, GA の影響

週 出 葉 数		4			5			6			7			8			9			10			11			12		
		1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3				
実験区																												
基本培養基	pH 5.20	0	8	6	12	20	0	24	0	20	0	32	0	0	36	30	0											
基本培養基	pH 6.00	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0											
+EDTA	pH 5.20	0	0	0	0	8	0	10	0	6	0	2	0	0	6	0	0											
+EDTA	pH 6.00	0	4	20	34	8	0	—	—	32	4	44	6	0	26	10	0											
+IAA 1 ppm	pH 5.20	0	0	16	0	28	0	16	0	8	2	22	8	2	18	6	0											
+IAA 10 ppm	〃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0											
+GA 1 ppm	〃	0	6	40	20	48	0	42	0	52	8	60	4	0	28	20	0											
+GA 10 ppm	〃	16	10	66	22	14	2	34	0	80	6	56	12	0	18	18	0											
+(IAA 1 ppm+GA 1 ppm)	〃	0	0	12	0	0	0	30	0	28	6	34	2	4	14	6	2											
+(IAA 10 ppm+GA 10 ppm)	〃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											

註. 数字は 50 個体中の展開葉を有する個体の百分率

また、基本培養基の pH が 6.00 の場合は、播種後 12 週間までは殆んど第 1 葉の展開が認められなかった (第 6 表)。

#### キレート剤、生長調整物質の影響

基本培養基に EDTA を添加すると、pH 6.00 の場合では、EDTA 無添加の対照区 (pH 5.20, 6.00) よりも生長が促進された。しかし、pH 5.20 では対照区よりも生長が抑制された (第 6 表)。

インドール酢酸単添加用：基本培養基に IAA を 1 ppm 添加した場合、第 1 葉の展開は対照区よりも遅れたが、第 2 葉の展開は促進された。10 ppm 添加では、生長が著しく抑制された (第 6 表)。

ジベレリン単添加用：GA 添加区は播種後 4 週間で、すでに第 1 葉を展開した個体が認められ、その後の生長も著しく促進され、第 1 葉を展開した個体数も多かった。また、濃度は 1 ppm よりも 10 ppm が生長をより促進した (第 6 表)。

インドール酢酸とジベレリンの併用：IAA と GA をそれぞれ 1 ppm 併用した場合、生長の初期には IAA の単添加用と同様に、生長が抑制されたが、播種後 9 週間以後は、むしろ生長が促進され、12 週間までに第 3 葉を展開した個体も認められた。濃度がそれぞれ 10 ppm 区は著しく生長が抑制され、出葉した個体は全く認められなかった (第 6 表)。

## 実 験 II

### 材 料 並 び に 方 法

実験 I の結果の再現性を確かめ、実験操作の不充分な点を改善する目的で、1 年後に、実験 I と同じような環境条件下で実験を反復した。

供試した培養基の種類、個数は右記の通りである。

供試したランの種類は実験 I と同様に、*Dendrobium nobile* である。種子は 1964 年 2 月 10 日に温室内で自家授粉させ、蒴が裂開した 1964 年 11 月 21 日 (開花後約 9 カ月) に採種したものである。

培養容器並びに基本培養基は実験 I で好結果を得た 100ml. の綿栓フラスコ、並びに微量要素を添加した Knudson C 培養基を用いた。

培養基の調製、殺菌、並びに種子の殺菌、播種は実験 I と同様な方法で行なったが、EDTA や IAA, GA の添加法を改善した。すなわち、EDTA は、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  を別の容器に溶した後、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  と

等モルの EDTA を添加し、その液を処方中の Knudson C 培養基に加えた。IAA 並びに GA は、予め Seitz の滅菌濾過器で無加熱的に滅菌しておいて、基本培養基の湿熱滅菌終了後、寒天凝固直前に加えた。

播種日は 1964 年 12 月 13 日で、播種後直ちに綿栓フラスコの綿栓部を硫酸紙で被い、室内に放置し、塩素ガスがぬけるのをまって、12 月 15 日に温室内に設けた 25°C のフレイムに入れた。

調査は、前記と同様に各実験区ごとに 12 個以上のフラスコを用意し、12 週間にわたって、毎週 (播種後 2 週間目は未調査)、各実験区から無作為に 1 個のフラスコを選び、試料を丁寧に採取

実 験 区	綿栓フラスコ Knudson C
基本培養基	pH 5.20 24本
基本培養基	pH 6.00 19
+EDTA	pH 5.20 20
+EDTA	pH 6.00 16
+IAA 0.1 ppm	pH 5.20 16
+IAA 1 ppm	" 20
+IAA 10 ppm	" 13
+GA 1 ppm	" 13
+GA 10 ppm	" 13
+GA 100 ppm	" 13
+(IAA 1 ppm+GA 1 ppm)	" 13
+(IAA 1 ppm+GA 1 ppm)	" 12

し、残った試料は処分して、次週には新しいフラスコの試料を調査に供した。

試料の測定は、試料をグリセリン酢酸で固定し、検鏡標本を作って、マイクロメーターで胚の大きさを測る（第7表）とともに、生長の進行度を9段階に分け、毎週300個体（1週間目は100個体）について観察し、生長程度の個体分散を調べた（第9, 10, 11表）。生長の進行度段階は以下のような規準に従って設けた。すなわち、

I 段階：胚が未だ種皮内に存在するもの（写真2, 3）。

II 段階：胚が種皮から出かかっているもの（写真4）。

III 段階：原塊体となっているもの（写真5, 6）。

IV 段階：根は認められず、第1葉が出葉しているもの（写真7, 9, 12, 15）。

V 段階：第1葉は認められないが、根が出ているもの。

VI 段階：根並びに第1葉が認められるもの（写真8）。

VII 段階：根は認められず、第2葉が出葉しているもの（写真16）。

VIII 段階：根並びに第2葉が認められるもの（写真10, 13）。

IX 段階：根並びに第3葉が認められるもの（写真11, 14, 17）。

生長の進行に伴う培養基の pH の変化を知るために、pH の測定を行なった。その方法は試料採取後、培養基を乳鉢で糊状に摩砕し、ガラス電極 pH メーター（東亜電波工業製 HM 5-A）で測定した（第12表）。

## 結 果

### 胚 の 肥 大

播種後1週間目の胚の長径、短径、並びに生長の進行度をそれぞれ第7表、第8表に示している。

胚の大きさは、実験区の間に明らかな差はなかった（第7表）。しかし、1 ppm 並びに10 ppm

第7表 胚の肥大に及ぼす pH, EDTA, IAA, GA の影響

実験区	大 き さ	1 週		
		長径	短径	短径/ 長径
基本培養基	pH 5.20	142 $\mu$	92 $\mu$	0.65
基本培養基	pH 6.00	145	92	0.63
+ EDTA	pH 5.20	138	86	0.62
+ EDTA	pH 6.00	140	93	0.66
+ IAA 0.1 ppm	pH 5.20	137	82	0.60
+ IAA 1 ppm	"	129	78	0.60
+ IAA 10 ppm	"	127	68	0.54
+ GA 1 ppm	"	143	85	0.59
+ GA 10 ppm	"	137	79	0.58
+ GA 100 ppm	"	119	74	0.62
+ (IAA 1 ppm + GA 1 ppm)	"	137	80	0.58
+ (IAA 1 ppm + GA 100 ppm)	"	142	81	0.57

註. 播種直前の胚の大きさは長径 139 $\mu$ , 短径 57 $\mu$ , 短径と長径の比 0.41, 数字は 100 個体の平均

第8表 1週間目の生長進行度

実験区	発育進行度段階	I II	
		I	II
基本培養基	pH 5.20	96	4
基本培養基	pH 6.00	95	5
+ EDTA	pH 5.20	98	2
+ EDTA	pH 6.00	98	3
+ IAA 0.1 ppm	pH 5.20	98	2
+ IAA 1 ppm	"	100	0
+ IAA 10 ppm	"	100	0
+ GA 1 ppm	"	96	4
+ GA 10 ppm	"	98	2
+ GA 100 ppm	"	99	1
+ (IAA 1 ppm + GA 1 ppm)	"	100	0
+ (IAA 1 ppm + GA 100 ppm)	"	100	0

註. 100 個体について調査

の IAA 添加区では、胚が種皮から出かかっている個体は全く認められなかった (第8表)。

### 基本培養基の pH の影響

第9表は播種後3週間以後の各実験区の調査個体を出葉別にわけ、百分率で表わし、第10表、第11表はそれぞれ播種後6週間目、12週間目の300個体の生長進行度を段階別に調べ、百分率で示した表である。

基本培養基の pH の影響は実験 I と同様に、6.00 よりも 5.20 が発芽率が高く、生長は促進され

第9表 生長に及ぼす培養基の pH, EDTA, IAA, GA の影響

実験区		週											
		出葉数											
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
		1	1	1	1	1	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2 3	
基本培養基	pH 5.20	0	3	15	10	13	16 1	21 1	17 5	17 6	15 8 1		
基本培養基	pH 6.00	0	1	14	7	7	10 0	9 0	9 4	12 2	8 3 0		
+ EDTA	pH 5.20	1	8	36	31	33	31 1	37 4	38 11	30 11	20 29 1		
+ EDTA	pH 6.00	0	1	26	15	16	31 1	37 2	24 2	32 11	14 11 0		
+ IAA 0.1 ppm	pH 5.20	0	1	2	1	1	8 2	0 0	10 1	2 0	3 0 0		
+ IAA 1 ppm	"	0	0	0	0	0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0 0		
+ IAA 10 ppm	"	0	0	0	0	0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0 0		
+ GA 1 ppm	"	4	13	44	49	29	41 3	— —	35 18	29 13	20 6 0		
+ GA 10 ppm	"	4	24	51	54	—	39 1	— —	26 4	— —	25 11 1		
+ GA 100 ppm	"	3	15	37	27	—	29 0	14 1	20 2	18 2	19 1 0		
+(IAA 1 ppm+GA 1 ppm)	"	0	0	0	0	0	0 0	0 0	0 0	— —	0 0 0		
+(IAA 1 ppm+GA 100 ppm)	"	0	0	0	0	0	0 0	0 0	— —	0 0	0 0 0		

註. 数字は出葉した個体の百分率, 300 個体について調査

第10表 生長進行度段階別個体分散 (6 週間目)

実験区		生長進行度段階					
		I	II	III	IV	V	VI
基本培養基	pH 5.20	27	29	28	4	5	7
基本培養基	pH 6.00	50	23	18	2	2	5
+ EDTA	pH 5.20	26	18	21	8	5	23
+ EDTA	pH 6.00	51	12	20	2	2	13
+ IAA 0.1 ppm	pH 5.20	25	25	43	0	6	1
+ IAA 1 ppm	"	95	5	0	0	0	0
+ IAA 10 ppm	"	99	1	0	0	0	0
+ GA 1 ppm	"	18	5	28	29	0	20
+ GA 10 ppm	"	18	7	21	36	0	18
+ GA 100 ppm	"	49	10	13	18	1	9
+(IAA 1 ppm+GA 1 ppm)	"	95	4	1	0	0	0
+(IAA 1 ppm+GA 100 ppm)	"	100	0	0	0	0	0

註. 数字は百分率, 300 個体について調査



第11表 生長進行度段階別個体分散 (12週間目)

発育進行度段階		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
実験区										
基本培養基	pH 5.20	29	22	24	1	1	14	0	8	1
基本培養基	pH 6.00	50	17	21	1	1	7	0	3	0
+EDTA	pH 5.20	13	13	24	2	1	17	0	29	1
+EDTA	pH 6.00	36	17	20	2	1	12	0	11	0
+IAA 0.1 ppm	pH 5.20	51	29	17	0	0	3	0	0	0
+IAA 1 ppm	"	98	2	0	0	0	0	0	0	0
+IAA 10 ppm	"	98	2	0	0	0	0	0	0	0
+GA 1 ppm	"	29	13	33	2	0	17	0	6	0
+GA 10 ppm	"	22	7	34	11	0	14	6	5	1
+GA 100 ppm	"	37	12	31	14	0	5	1	0	0
+(IAA 1 ppm+GA 1 ppm)	"	89	10	1	0	0	0	0	0	0
+(IAA 1 ppm+GA 100 ppm)	"	81	18	1	0	0	0	0	0	0

註. 数字は百分率, 300 個体について調査

た. pH 6.00 区は約50%が不発芽であった (第9, 10, 11表, 写真19, 20).

#### キレート剤, 生長調整物質の影響

EDTA 添加区は pH 5.20 区, 6.00区のいずれも対照区より生長が促進され, 葉色が濃い, 健全な幼苗が得られた (第9, 10, 11表, 写真29, 30).

インドール酢酸単独加用: 実験 I で IAA を 1 ppm 添加した場合は, 実験期間の後期に生長が促進されていたので, 実験 II では, 発芽率を高め, 初期の生長促進も企る目的で, 新たに 0.1 ppm 添加区を設けて, その効果を期待したが, この 0.1 ppm 区では, 実験 I の IAA 1 ppm 添加区, 実験 II の対照区に比して, 生長はかなり抑制された. また, 1 ppm 及び 10 ppm 添加区は発芽率が極めて低く, 出葉した個体は全く認められなかった (第9, 10, 11表, 写真 24, 25, 26).

ジベレリン単独加用: GA 添加区は, 実験 I と同様の傾向を示し, 初期の生長が著しく促進され, 特に, 低濃度の区においてその傾向は強かった. しかし, 後期になると GA の効果は減少する傾向を示した (第9, 10, 11表, 写真 21, 22, 23).

また, 濃度が高くなるに従って茎葉が細く, 葉色が淡くなった (写真 15, 16). 更に, 無発根個体が多く認められた (第10, 11表).

インドール酢酸とジベレリンの併用: IAA, GA のそれぞれ 1 ppm の併用の影響は, IAA 単独加用の影響と殆んど同じく, 種子は不発芽に終わったものが多く, 出葉した個体は全く認められなかった (第9, 10, 11表, 写真 27, 28).

#### 生長の経過に伴う培養基の pH の変化

培養基の pH は播種後 4 週間までは大きな変化は認められなかったが, 6 週間頃から急速に酸性に傾いた. また, 生長が促進された区ほど, より酸性に変化する傾向が認められた (第12表).

第12表 生長の経過にともなう培養基の pH の変化 (15°C)

実 験 区	週	pH 調 整 時	播種時	4	6	8	10	11	12
基本培養基	pH 5.20	5.20	5.27†	5.24*	4.20	4.11*	3.84	3.75	3.66*
基本培養基	pH 6.00	6.00	6.00	5.18*	4.22	4.21*	3.82	3.73	3.71*
+EDTA	pH 5.20	5.20	5.00	4.58*	3.64	3.84*	3.30	3.43	3.26*
+EDTA	pH 6.00	6.00	5.87	5.08†	4.41	4.01	3.82	3.56	3.40*
+IAA 0.1 ppm	pH 5.20	5.20	5.62	6.20	4.23	4.36*	4.31	4.03	3.83†
+IAA 1 ppm	〃	5.20	—	5.67*	4.93	4.33*	4.53	4.12	4.20*
+IAA 10 ppm	〃	5.20	—	—	4.63	4.46†	4.82	3.85	4.04†
+GA 1 ppm	〃	5.20	—	4.20	3.73	4.10	3.59	3.54	3.50
+GA 10 ppm	〃	5.20	—	—	4.10	3.68	3.63	—	3.51
+GA 100 ppm	〃	5.20	—	—	4.28	4.02	3.73	3.57	3.75
+(IAA 1 ppm+GA 1 ppm)	〃	5.20	—	5.73	4.87	4.80	4.60	—	4.32
+(IAA 1 ppm+GA 100 ppm)	〃	5.20	—	5.75	4.28	3.02	—	4.29	4.21

\* 印は供試フラスコ 3 本の平均

† 印は供試フラスコ 2 本の平均

無印は供試フラスコ 1 本

## 考 察

## 培養容器について

ランの無菌培養の培養容器については、多くの研究者によってそれぞれ工夫され、供試するランの種類により、最適な容器は異なるようである<sup>21)</sup>。塚本氏等 (1961)<sup>20)</sup> は密閉した容器では、*Laeliocattleya* の発芽とその初期生育は良好であったが、後期には生育が異常となり、ガラス管付きゴム栓をした容器中での *Laeliocattleya* の生育は正常で、綿栓をした容器中での生育より良好であった、と述べている。

沢氏等 (1961)<sup>16)</sup> はシュンラン種子の寒天無菌培養を行ない、試験管に綿栓をした場合は4カ月後でも発芽をみず、3角フラスコにゴム栓をした場合、室内区は寒天表面上に長期間水分を保持し2カ月頃より発芽し始めたが、日照区は水分保持が悪く発芽しない、と報告している。また、狩野氏等 (1963, 1964)<sup>7)8)9)</sup> はシュンランの発芽は殺菌した種子を水に5時間浸漬することにより、著しく促進され、発芽困難な種子の発芽は容器を密閉することにより促進されるとも報告している。更に、*Brassolaeliocattleya* の発芽床における栓の種類の影響を調べ、初期の生長は完全にシールすることにより促進される。しかし、やがて根毛の多い根を上向きに生じ、地上部の生長は抑制されて枯死する。もっとも良い生長は、初期に完全シールし、根が上向き始めたころに通気の可能な区でみられる、と述べている。

Meyer 氏 (1948)<sup>13)</sup> は培養フラスコを密閉した場合の幼苗の生長が綿栓フラスコの場合よりもすぐれていることを知り、外部からの空気の供給が必要でないということは、有機物の合成に炭素源として培養基中の糖を利用しているからである、と述べている。

以上の事実から、ランの種類によることは勿論であるが、発芽に好適な容器中の条件と、その後の生長に好適な条件は区別して考えなければならない。

本実験では、*Dendrobium nobile* の発芽と初期の生長は、綿栓フラスコが最も良好で、次いで、ゴム栓をした枝付フラスコで、ビニール管付ゴム栓フラスコでは、播種後2週間までの胚の肥

大は他の容器のそれと大差はなかったが、その後、出葉した個体は全く認められなかった。

なお、White 氏 (1954)<sup>26)</sup> は植物の組織培養では空気の流通が重要であるので、通常、容器はモスリンで覆った綿栓を用うべきであるが、綿栓は培養液の急速な蒸発、ダニや雑菌の侵入で不便であるので、普通の実験にはアルミニウム箔がよい、と述べている。また、綿栓容器での動物の組織培養には  $\text{CO}_2$  がなくなり、pH の上昇をきたすので、ゴム栓が必要であるが、天然、あるいは、合成ゴムの栓は培養液が凝集した場合に有害物質を出すのでシリコンなどの特別なゴム栓を推奨している。

#### 培養基の組成について

Knudson 氏 (1922)<sup>10)</sup> がランの無菌培養法に成功して以来、すでに今日まで、多数の研究者によって色々な組成をもつ数10にものぼる培養基が発表されているが、<sup>27)</sup> ランの種類によって、また、生長段階によっても要求する養分源及びその最適量は異っている。例えば、Raghavan, Torrey 両氏 (1964)<sup>14)</sup> は *Cattleya* の無菌培養で、無機の窒素源としてアンモニア態窒素と硝酸態窒素を比較し、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  のようなアンモニア態窒素ではよく発芽し、生長するが、 $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{KNO}_2$ ,  $\text{NaNO}_2$  のような硝酸態窒素では pH を変えたり、カイネチン、モリブデン、アスコルビン酸を添加しても幼苗の発育は悪く、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を含む培養基で60日以上培養後、 $\text{NaNO}_3$  を含む培養基に移植した場合は正常に生長した、と述べている。

本実験では、*Dendrobium nobile* の初期生長には微量要素を加えた Knudson C 培養基が同量の微量要素を加えた La Garde 培養基よりも優れていた。

このことは、種々の培養基を用いて、本実験と同組成、同量の微量要素を添加して行なった他の研究者の実験<sup>19)</sup>と一致している。すなわち Knudson C 培養基は *Dendrobium* の他、*Cattleya*, *Vanda*, *Phalaenopsis* で優れているが、*Odontoglossum*, *Miltonia* では La Garde 培養基が優れ、*Cymbidium* では両培養基とも同等であった。また、鳥潟氏等 (1965)<sup>18)</sup> は、Knudson B 培養基、Knudson C 培養基、トマト汁培養基を用いて *Cymbidium* および *Dendrobium* (*D. Merlin* × *D. Sir F. Moor*) の発芽、発育に及ぼす影響をしらべ、両植物とも Knudson C 培養基がよい成績を納めた、と報告している。

#### 培養基の pH 並びに pH の変化について

ランの幼苗を培養している培養基の pH を一定に保持しようとする試みは、Burgeff 氏 (1936)<sup>1)</sup> や Vacin, Went 両氏 (1949)<sup>22)23)</sup> 等によって行なわれ、一応の成功はみているが、生長に及ぼす効果は必ずしもあがっていないようである<sup>27)</sup>。更に、Knudson C 培養基を最初 pH 5.16 に調整して幼苗を育て、33カ月後に pH が3.0になっていた<sup>11)</sup>例をあげ、Withner 氏は pH がほぼ5.3以上では不溶性の化合物として沈澱しやすい鉄、カルシウム、磷、その他の無機養分の有効性に及ぼす pH の影響以外には、pH は生長に決定的影響をもつとは思われない<sup>27)</sup>、と述べている。

本実験では、微量要素を加えた Knudson C 培養基の pH を5.20と6.00に調整して、発芽並びにその後の生長を観察したが、発芽、生長共に5.20が優れていることが認められた。しかし、両区においては、播種後6週間頃から急速に酸性に傾き、12週間後には、いずれもほぼ3.7位にまで低下した。また、生長が良好な区ほど酸性になる傾向が強いのは、Knudson C 培養基中の窒素源である  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  の窒素がランの幼苗によって吸収され、残っている硫酸イオンのためと考えられる。一方、播種時の種子状態から殆んど生長が進行していない IAA 1 ppm、および 10 ppm 添加区 (初期の pH が5.20より高いのは、基本培養基を5.20に調整後、アルカリ性である

IAA を添加したためである)でも6週間頃から酸性に傾いたことは、前記の考えと矛盾する。培養基の pH は、培養基中の陰、陽両イオンの植物による不平等な吸収によって変化することは勿論であるが、緩衝能が低い培養基で、しかも、綿栓フラスコのように自由に空気が流通する容器中では、永く放置すると、植物が生長していなくても、酸性化されと考えられよう。

#### キレート剤について

1951年、Jacobson氏<sup>6)</sup>が培養液中の鉄の供給を維持する目的で鉄キレートを使用して以来、金属キレートは色々な条件下で、種々の植物の養分供給に応用されつつある<sup>3)5)17)24)25)29)</sup>。ランの無菌培養への応用も例外ではなく、Withner 氏はその著書で、pH の変化に伴う金属イオンの不溶性化を阻止する為に、金属イオンのキレートが有用で、溶液の pH によって容易に影響されない養分源となりうるので、pH と生長との関係は更に追究されなければならない、と述べ、氏の研究室での予備実験で鉄キレートが培養基中のランの養分源に十分なりうることをみている。

本実験では、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  と等モルの EDTA を加えて (5 ppm の鉄濃度)、pH を 5.20、6.00 に調整した場合の生長反応を調査した。実験 I では培養基処方中、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  を加えて直ちに EDTA を入れたが、実験 II では EDTA の添加法を変え、先ず、培養基の各成分を溶かす蒸留水 1ℓ の中から少量をとり、これに  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  を溶かして後、EDTA を等モル加え、スターラーで攪拌後、各成分の溶解順に従って、準備していた上記の鉄キレート溶液を加えた。実験 I では、生長に対し pH 6.00 の場合が pH 5.20 の場合よりも優れ、対照区に比べても初期の生長を促進する傾向が認められた。一方、pH 5.20 の場合は対照区に比べてその生長は劣っていた。実験 II では実験 I とは逆に、pH 5.20 の場合が pH 6.00 よりも、発芽、生長に対して優れていて、対照区に比べても促進作用が認められた。また、pH 6.00 の場合は対照区に比べて、種子の発芽は悪かったが、幼苗の生長は優っていた。EDTA 添加区は全般的に葉色が濃い、健全な苗が多く認められた。

以上の結果は Jacobson 氏の結果<sup>6)</sup>と一致する。すなわち、氏は Hoagland 液に 3 ppm の鉄が含まれるようにして、鉄と EDTA のモル比を変えて、トマト、ヒマワリ、トウモロコシ、オオムギを育てたところ、等モルの場合が最も満足な結果を得ている。更に、鉄キレートの形で 5 から 100 ppm の鉄を含む Hoagland 液でトマト、トウモロコシを栽培し、100 ppm では両植物とも、特に、生長の初期段階では有害で、50 ppm は若干の害が現われ、25 ppm 以下では植物はよく育ち、濃緑色となったと述べ、鉄キレートの形で 5~10 ppm の鉄を一回施用すると無害で、十分である、と報告している。

#### インドール酢酸について

ランの初期生長の促進を企る目的で、培養基に植物生長調整物質を使用した例は多く、また、用いられた薬品の種類も多数にのぼっている<sup>27)</sup>。Curtis, Nichol 両氏 (1948)<sup>2)</sup> は、IAA は *Vanda* の胚には影響しなかったが、*Cymbidium* の胚には強く影響し、胚は最初、黒変したが後では再び生長点部位より生長し、結局無処理との差はなかったと報告している。また、Mariat 氏 (1952)<sup>12)</sup> は、IAA は無菌培養で、*Cattleya* の幼苗の生長を促進した (1 ppm で最大) と述べている。

本実験では 0.1, 1, 10 ppm の濃度の IAA を添加して初期生長に及ぼす影響を調べた。実験 I では、1 ppm と 10 ppm になるように培養基湿熱滅菌前に添加し、実験 II では、培養基湿熱滅菌後、培養基凝固直前に無加熱的、無菌的にそれぞれ 0.1, 1, 10 ppm になるように添加した。その結果、実験 I では、IAA 1 ppm の場合は発芽が抑制されたが、後期には対照区と比較して生長が促進された。また、10 ppm 区は発芽も、その後の生長も全く抑制された。実験 II で

は、0.1, 1, 10 ppm 区とも発芽が抑制され、特に 1, 10 ppm 区は顕著であった。また、0.1 ppm 区では実験 I と異り、その後の生長も対照区に比較して抑制された。以上の結果から ① IAA は 0.1 ppm でも発芽・生長を抑制する。② 実験 I の 1 ppm 添加による発芽後の生長促進は添加方法に問題があり、IAA が可成り分解され——一般に IAA は不安定な物質で、光や熱によって分解される<sup>4)</sup>——培養基中で 0.1 ppm 以下まで低下した為であると考えられる。従って、IAA によって、*Dendrobium* の発芽後の生長を促進する為には、0.1 ppm 以上の濃度では使用すべきでないといえよう。

鳥潟氏等 (1965)<sup>18)</sup> は、*Cymbidium* の発芽に対しては、NAA は 0.1 ppm でも抑制作用があり、10 ppm では著しく阻害作用 (褐変 protocorm が多数でる) があり、実生に対しては 0.1~1.0 ppm で顕著に发育を促進したとし、これはランの種子の発芽と生長の各段階に対し生長ホルモンの最適濃度が異なるためであると思われる、と述べている。

#### ジベレリンについて

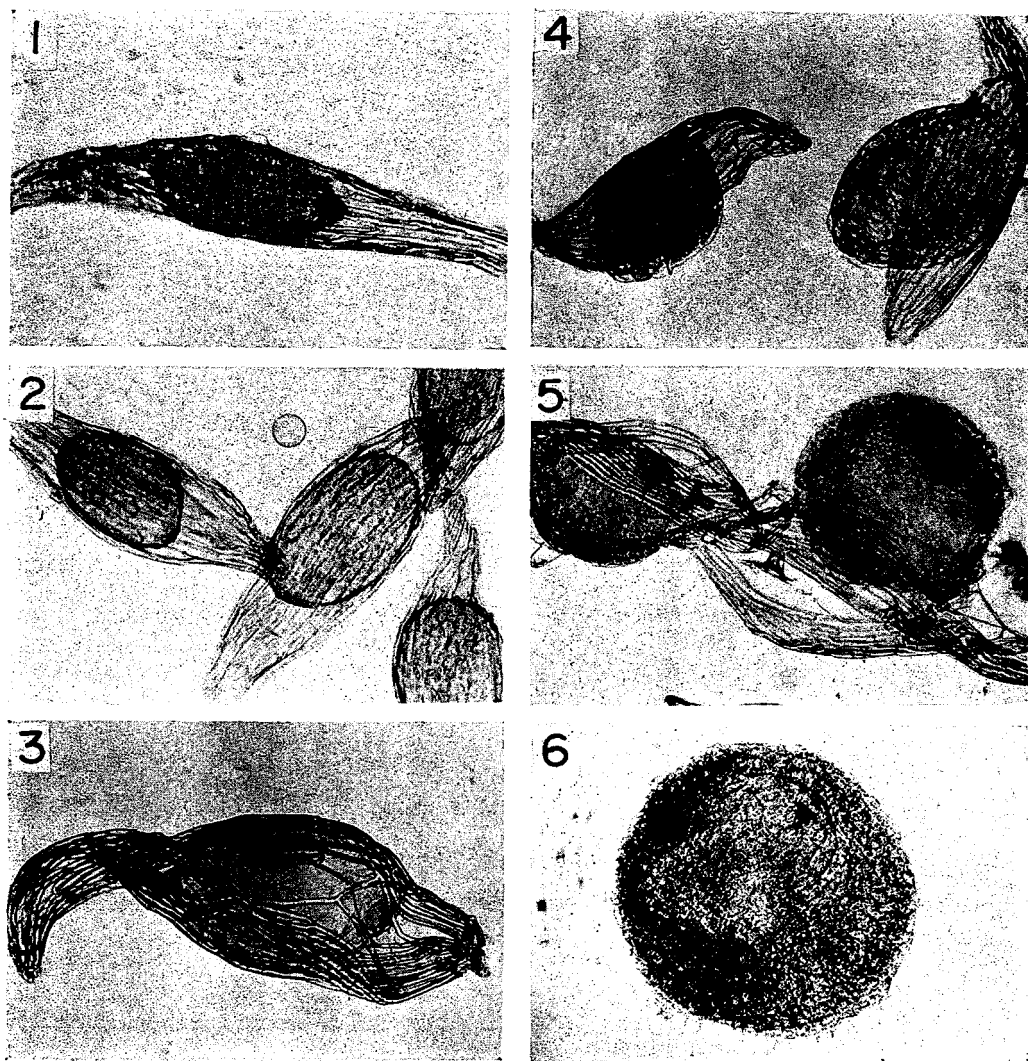
沢氏等 (1960)<sup>15)</sup> は、*Cymbidium* の幼植物の成育に対する GA (50, 100 ppm) の影響について観察し、草だけは無処理に比し著しく伸長したが、約 3 ヶ月後より淡緑色を呈し、茎は細くなり、発根悪く生体重も小であり、なお、protocorm の異常伸長が見られた、と述べている。また、塚本氏等 (1961)<sup>20)</sup> は *Cattleya*, *Bletilla*, *Dendrobium* の種子および幼苗を使って、GA の有用性を調べ、GA の濃度が増加すると、地上部の生長は徒長気味となるが、地下部の生長はおさえられた、と報告している。

本実験でも、GA 処理は濃度が高くなるに従って茎葉は細長くなり、播種後 12 週間頃になると淡緑色となった。しかし、根の生長は全く抑制されるのではなく、GA 処理で無発根個体数も多くなっているが、低濃度では発根個体数も多く、全般的に生長が進んでいるので、低濃度の GA 処理はランの初期生長には有効であるといえよう。一般に GA 処理を行なう場合は、他の養分の補給を無処理の場合よりも多く必要とするといわれているので、GA 処理により後期 (第 2, 3 葉出葉期頃から) の生長が悪くなったのは、養分の不足によるものであろう。従って、GA 処理の場合は、或る程度生長が進んだ段階で養分補給を試みるか、培養基の組成や濃度を工夫することによって、ランの無菌培養における初期生長促進に優れた効果を示すものと考えられる。

#### 引用文献

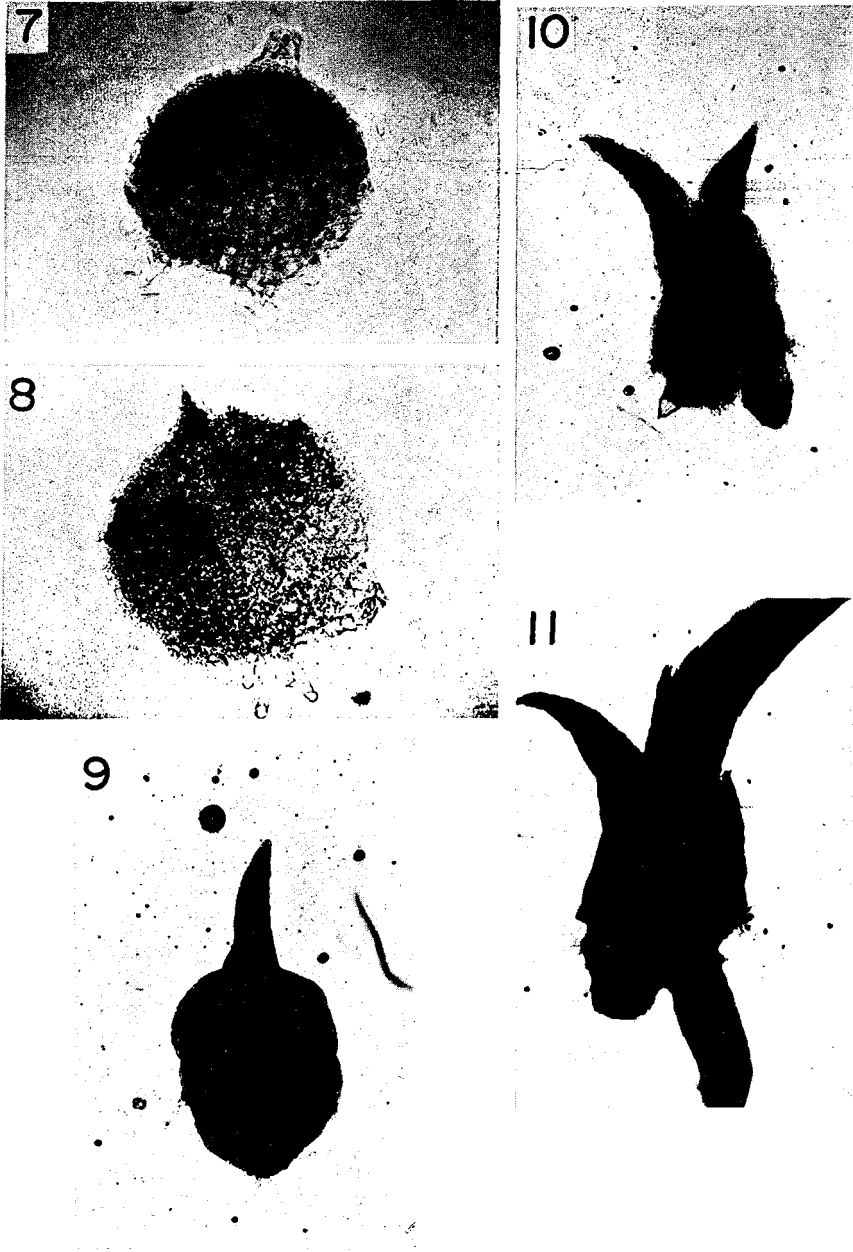
1. Burgeff, H. (1936): Samenkeimung der Orchideen. G. Fisher, Jena p. 312 (cited from Withner, C.L. 1959: The orchids. p. 336).
2. Curtis, J. T., & Nichol, M. A. (1948): Culture of proliferating orchid embryos in vitro. Bull. Torrey Bot. Club 75: 358~373 (cited from Withner, C. L. 1959: The orchids. p. 334).
3. DeRemer, E. D., & Smith, R. L. (1961): The effects of chelates and chelated cations in increasing the availability of phosphorus from insoluble sources. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 77: 513~519.
4. 林武・村上浩 (1963): 植物ホルモン. 戸荻・山田・林編 作物生理講座 1: 111~167 朝倉書店.
5. 今村寿明 (1961): 植物の微量供給源としての金属—EDTA キレート化合物. 水産増殖 10(3): 37~49.
6. Jacobson, L. (1951): Maintenance of iron supply in nutrient solutions by a single addition of ferric potassium ethylenediamine tetra-acetate. Plant Physiol. 26: 411~413.
7. 狩野邦雄・勝浦孝昌 (1963): ランの無菌発芽に関する研究. (第 5 報). 園芸学会昭和 38 年春季大会研究発表要旨 p. 41.
8. ——— (1964): ランの無菌発芽に関する研究. (第 6 報). 園芸学会昭和 39 年春季大会研究発表要旨 p. 55~56.
9. ———・大友隆英・塚本洋太郎 (1964): ランの無菌発芽に関する研究. (第 7 報). 同上 p. 42.

10. Knudson, L. (1922): Non-symbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 73: 1~25 (cited from Withner, C. L. 1959: The orchids. p. 320).
11. ——— (1951): Nutrient solutions for orchids. Bot. Gaz. 112: 528~532.
12. Mariat, F. (1952): recherches sur la physiologie des embryons d'Orchidées. Rev. Gén. Bot. 59: 324~377 (cited from Withner, C. L. 1959: The orchids. p. 332~334).
13. Meyer, J. R. (1948): Germinação de sementes de orquídeas em recipientes herméticamente fechados. O Biológico 14: 13~15 (cited from Withner, C. L. 1959: The orchids. p. 336).
14. Raghavan, V. & Torrey, J. G. (1964): In organic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, cattleya. Amer. Jour. Bot. 51(3): 264~274.
15. 沢完・鳥潟博高・志佐誠 (1960): ラン種子の発芽生理に関する研究. (第2報). 園芸学会昭和35年度秋季大会研究発表要旨 p. 37.
16. ——— (1961): ラン種子の発芽に関する研究. (第3報). シュンラン種子の発芽について. 園芸学会昭和36年度秋季大会研究発表要旨. p. 33.
17. Stebbins, R. L., Johnson, G., & Johnson, D. K. (1963): Responses of peach to applications of nitrogen and chelated iron in Colorado. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 82: 114~119.
18. 鳥潟博高・沢完・志佐誠 (1965): ラン種子の無菌発芽に関する研究. (第1報). *Cymbidium* 種子の発芽および発育について. 園学雑 34(1): 63~70.
19. 塚本・楢山・坂西・脇坂・堀 (1961): 洋蘭概説. 原色薔薇洋蘭図鑑 p. 136. 保育社.
20. 塚本洋太郎・狩野邦雄・勝浦孝昌 (1961): ランの無菌発芽に関する研究. (第2報). 園芸学会昭和36年度秋季大会研究発表要旨 p. 33.
21. ——— (1964): 欧米の花き生産現況. (11) 洋らんの実生と育種. 農及園 39(3): 557~560.
22. Vacin, E. F., & Went, F. W. (1949): Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110: 605~613.
23. ———, & ——— (1949): Use of tomato juice in the asymbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 111: 175~183.
24. Wallace, A., North, C. P., Mueller, R. T., & Hemaidan, N. (1953): Chelating agents as a means of supplying micro nutrients to woody plants in alkaline and calcareous soils. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 62: 116~118.
25. ———, ———, ———, & Shannon, L. M. (1955): Behavior of chelating agents in plants. *ibid.* 65: 9~16.
26. White, P. R. (1954): The cultivation of animal and plant cells. p. 66. The Ronald Prees Company, New York.
27. Withner, C. L. (1959): Orchid physiology. p. 315~360. In Withner, C. L. (ed.), The orchids. The Ronald Prees Company, New York.
28. Yates, R. C., & Curtis, J. T. (1949): The effect of sucrose and other factors on the shoot-root ratio of orchid seedlings. Amer. Jour. Bot. 36(5): 390~396.
29. 吉田昌一 (1965): 植物の微量要素栄養における最近の進歩. 植物生理 4(4): 212~221.



No. 1～8 *Dendrobium nobile* の種子の発芽・生長過程

- No. 1 播種前の種子
- No. 2 肥大した胚
- No. 3 胚が肥大して、種皮が裂けた状態
- No. 4 種皮より胚が出ている状態
- No. 5 原塊体—仮根が認められる
- No. 6 原塊体一色の濃淡が認められる



No. 7 上方の突起は第1葉の原基, その反対側の多数の突起は仮根

No. 8 第1葉並びに根の原基が認められる

No. 9~17 播種後12週間目の幼苗 (実験Ⅱ)

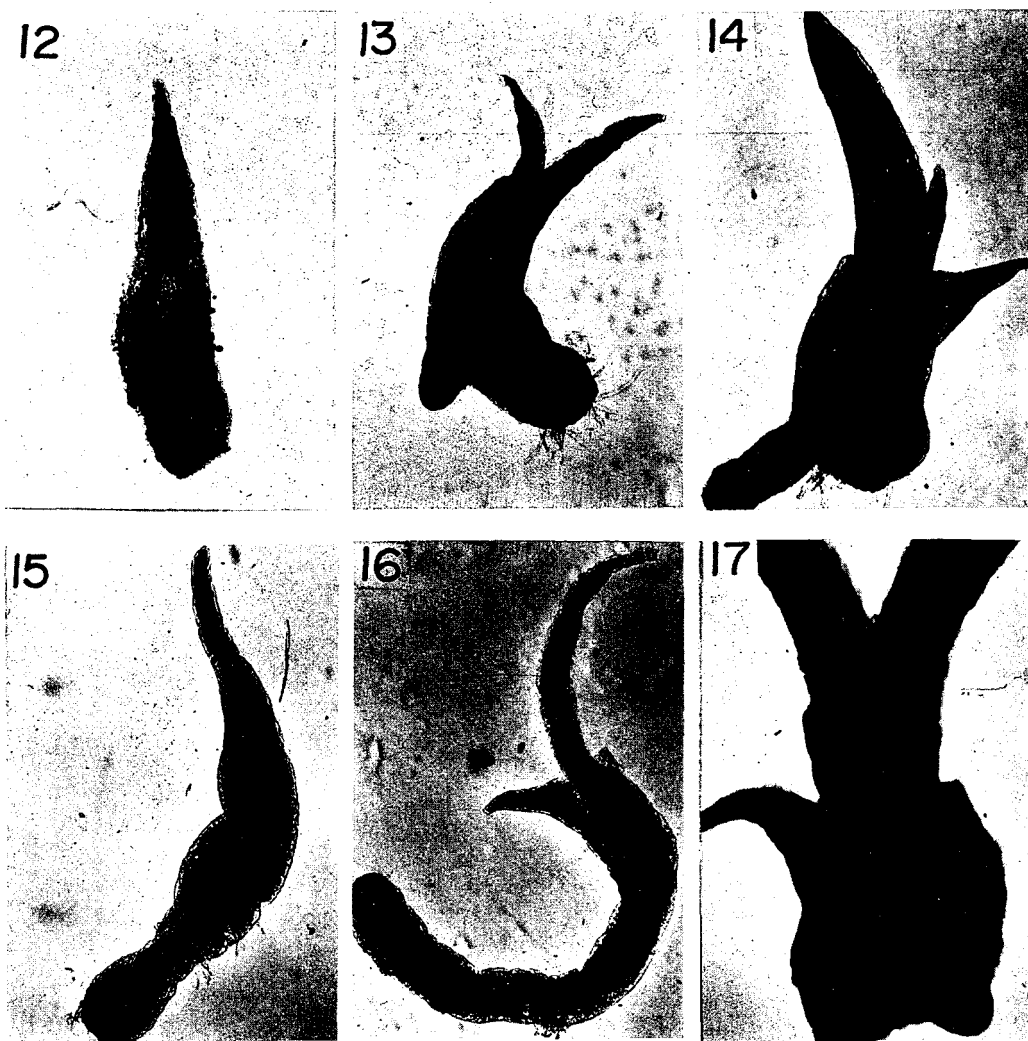
No. 9~11 基本培養基 pH 5.20 区の幼苗 (×25)

No. 9 第1葉がかなり伸長している

No. 10 第1, 2葉並びに根が認められる

No. 11 第1, 2, 3葉並びに根が認められる





No. 12~14 GA 10 ppm 添加区の幼苗 (×25)

No. 12 茎・葉がやや細い

No. 13 第1, 2葉並びに根が認められる

No. 14 第1, 2, 3葉並びに根が認められる

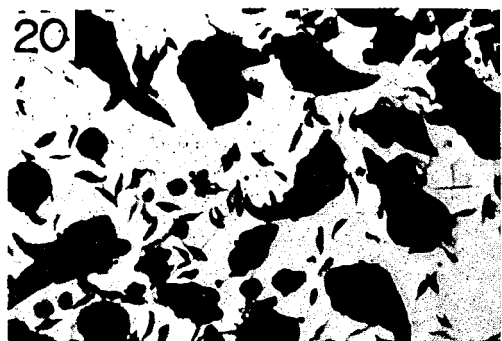
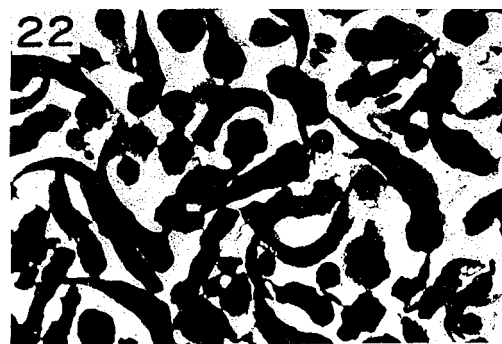
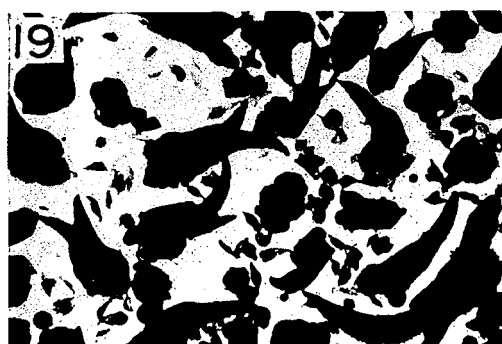
No. 15~16 GA 100 ppm 添加区の幼苗 (×25)

No. 15 茎・葉が異常生長をしている

No. 16 第1, 2葉が認められるが, 茎・葉は異常生長をしている

No. 17 EDTA 添加 pH 5.20 区の幼苗 (×25)

No. 17 第1, 2, 3葉並びに根が認められる. 葉色が濃く, 茎も太い



No. 18 播種直前の種子 (×10)

No. 19~30 播種後12週間目の各実験区の生長状態 (実験Ⅱ) (×10)

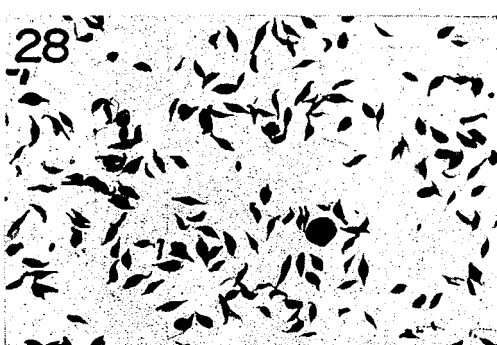
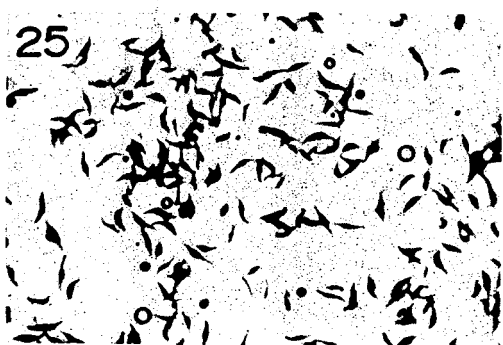
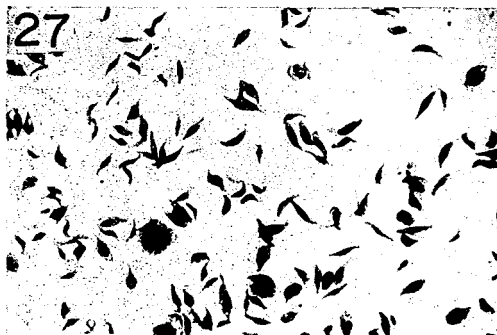
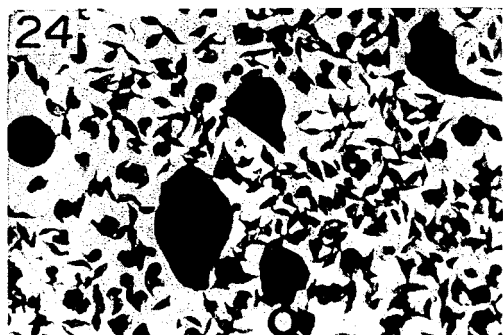
No. 19 基本培養基 pH 5.20 区

No. 20 基本培養基 pH 6.00 区

No. 21 GA 1 ppm 添加区

No. 22 GA 10 ppm 添加区

No. 23 GA 100 ppm 添加区



- No. 24 IAA 0.1 ppm 添加区  
 No. 25 IAA 1 ppm 添加区  
 No. 26 IAA 10 ppm 添加区  
 No. 27 IAA 1 ppm, GA 1 ppm 併用区  
 No. 28 IAA 1 ppm, GA 100 ppm 併用区  
 No. 29 EDTA 添加, pH 5.20 区  
 No. 30 EDTA 添加, pH 6.00 区